

DOI: 10.13376/j.cbbs/2018110

文章编号: 1004-0374(2018)09-0916-10



李劲松, 研究员, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所研究组长(PI)、细胞生物学国家重点实验室主任。1993年在江西农业大学获学士学位, 1996年在扬州大学获硕士学位, 2002年在中科院动物研究所获博士学位。2002—2007年在洛克菲勒大学接受博士后训练, 2007年入选中科院“百人计划”, 并聘为研究员。主要从事细胞重编程与胚胎发育研究, 已发表论文70余篇, 其中作为通讯或共同通讯作者在 *Cell*、*Nature*、*Cell Stem Cell*、*Cell Research* 等杂志发表22篇研究论文, 论文多次被 *Nature*、*Cell*、*Nat Rev Genet*、

Cell Stem Cell、*F1000 Prime* 等作为研究亮点点评。实验室围绕细胞重编程与胚胎发育开展系统研究, 建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞(即“人造精子”), 证明其能代替精子使卵母细胞受精产生健康小鼠(即“半克隆技术”), 并利用“人造精子”携带 CRISPR-Cas9 文库实现了小鼠个体水平的遗传筛选; 证明 CRISPR-Cas9 技术在遗传疾病治疗中具有重要作用。研究成果先后入选 2011 年和 2012 年“中国科学十大进展”, 以“人造精子”为代表的细胞重编程的相关系统性研究荣获 2017 年上海市自然科学奖一等奖, 并为中国科学家主导开展的小鼠基因组标签计划(Genomic Tagging Project)奠定了理论与技术基础。

CRISPR/Cas9系统应用于早期胚胎编辑和基因治疗

张晓宇^{1,2}, 唐蔚¹, 李劲松^{1,2*}

(1 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 分子细胞卓越中心, 上海 200031;

2 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要: CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) 系统具有高效、精确、操作难度较低等特点, 是目前应用最为广泛的基因编辑工具。CRISPR/Cas9 在构建模式动物突变体研究基因功能和构建人类疾病模型中有大量使用, 但是由于相关伦理限制, 在人类胚胎中进行基因编辑来探索治疗性胚胎编辑和研究人早期胚胎发育机制的研究发展较慢。人类胚胎发育机制与小鼠等模式动物的早期胚胎发育机制存在较大差异, 过往在模式动物上研究的早期胚胎发育机制要在人类胚胎水平进行验证, 对人类胚胎利用基因编辑工具进行直接研究越发必要, 探索人类早期胚胎发育机制有助于相关发育疾病的研究与治疗。胚胎治疗性基因编辑可以实现对遗传疾病的彻底阻断, 目前还处于初步探索时期, 但是主要存在潜在脱靶和编辑后形成嵌合体两方面问题。相较而言, 出生后个体水平的基因治疗目前发展较为快速, 对遗传疾病和艾滋病等血液疾病有应用价值。现对 CRISPR/Cas9 近年来应用于人类胚胎编辑和基因治疗的内容进行了综述。

关键词: CRISPR/Cas9; 胚胎编辑; 基因编辑; 基因治疗

中图分类号: Q25; Q3 **文献标志码:** A

CRISPR/Cas9 system in early-stage embryo genome editing and gene therapy

ZHANG Xiao-Yu^{1,2}, TANG Wei¹, LI Jin-Song^{1,2*}

收稿日期: 2018-07-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31530048, 81672117, 31730062)

*通信作者: E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

(1 CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2 State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai 200031, China)

Abstract: CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) system is the most widely used genome editing tool in recently several years, standing out as an efficient and precise method which is easy to handle. CRISPR/Cas9 promotes the generation of genetic mutation animal models and human disease models. Because of ethical problem, genome editing in human embryo is strictly restricted. Human early-stage embryo development mechanism has a mount of differences compared with mouse and other model organisms, so the previous findings need to be verified in human and the need to study human embryo directly is rising, which will promote learning and curing the developmental diseases. Genome editing can fundamentally block heritage diseases, through facing two major issues, off-target and mosaic. Compared with therapeutic human embryo genome editing, at this stage, gene therapy on postnatal stage progresses more rapidly aiming at curing genetic disease and hematologic diseases such as AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). This review focus on the human embryo genome editing and gene therapy achievement in the past three years.

Key words: CRISPR/Cas9; embryo editing; genome editing; gene therapy

CRISPR/Cas9 基因编辑系统是近几年兴起的新的基因编辑工具, 该技术从原核生物抵抗病毒入侵、清除病毒基因组的系统中优化而来^[1-2], 成为继锌指核酸酶技术和 TALENS 技术后的第三代基因编辑工具, 并凭借其高效性和低的操作难度, 在绝大多数应用方面迅速超越、替代前两个技术, 成为现今主流的基因编辑工具。Cas9 蛋白在 sgRNA 引导下对基因组引入双链断裂损伤, 结合细胞内相关修复机制可以实现敲除、敲入等基因组编辑方式^[3]。其后的多种衍生工具, 如单碱基编辑工具, 丰富了 CRISPR/Cas9 在各方面的用途^[4-5]。CRISPR/Cas9 在小鼠和非人灵长类等模式动物上有较多研究和大量应用, 推进了相关突变体模式动物的构建。早期 CRISPR/Cas9 系统主要应用于人类相关细胞系水平上的研究。由于伦理限制和研究材料获取难度大等问题, 人类胚胎水平基因编辑发展较慢。2015 年, 由中国科学家率先在人类三原核胚胎进行了基因编辑^[6], 尔后 2017 年, 国外科学家又对人类正常受精来源的胚胎进行基因编辑, 研究人早期胚胎发育机制和治疗性胚胎编辑^[7-8]。由于多方面的优势, 早期胚胎发育相关机制和过程多利用小鼠等模式生物研究, 但是越来越多的研究表明, 人和小鼠的早期胚胎发育过程存在较大差异, 相关机制也越发需要在人类胚胎上进行验证和研究。嵌合体问题和潜在的脱靶是 CRISPR/Cas9 在人早期胚胎基因编辑中遇到的技术瓶颈, 通过优化基因编辑组分和胞浆注射时间可以降低嵌合体问题, 通过较早引入双链断裂损伤, 同时依赖母源基因组作为同源重组修复模板的方式, 可以构建父源遗传突变被修复的非嵌合

体胚胎^[8], 而通过优化 sgRNA 的设计和验证过程可以尽可能降低基因编辑脱靶概率。胚胎水平的基因治疗目前还只迈出了第一步, 距离应用还有相当长距离, 而 CRISPR/Cas9 应用于成体水平对体细胞或者干细胞基因编辑伦理压力较小, 同时也是从根本上治疗相关遗传疾病的有效途径。成体水平的基因治疗为人类获得性免疫缺陷综合征^[9]、遗传性耳聋等疾病^[10]的治愈提供了新的方法和希望。CRISPR/Cas9 系统作为新型高效基因编辑工具在模式动物人类疾病模型中已有优异的表现, 今后有望在出生后个体水平基因治疗领域发挥威力。

1 CRISPR技术背景简介

CRISPR/Cas9 基因编辑系统是由原核生物 II 型 CRISPR/Cas 系统改进而来, Cas9 蛋白可以结合人工设计的 sgRNA 形成核糖核蛋白, 在 sgRNA 的引导下靶向基因组的目标序列。传统的 *Streptococcus thermophilus* 开发来的 spCas9 蛋白需要基因组靶序列上游存在 NGG 的 PAM 结构基序^[11]。Cas9-sgRNA 与基因组目标序列形成三元复合物之后, Cas9 的两个 DNA 酶结构域可以切割 DNA 的磷酸酯键, 最终形成双链断裂损伤 (DSBs), DSBs 会激发细胞本身的两种 DNA 损伤修复机制, 同源重组修复 (HDR) 机制和非同源重组末端直接连接 (NHEJ) 修复机制^[12]。HDR 修复主要是在内源或者外源同源供体 DNA 存在的情况下对 DSB 进行修复, 使用人工设计的外源的单链或者双链供体 DNA 可以对目标靶序列进行 DNA 序列的敲入^[3]和辅助大片段敲除^[13], 或者构建点突变^[14]。NHEJ 修复途径不依赖同源重

组方式，而是在相关蛋白的介导下双链断裂直接连接修复，但是在修复过程中会产生插入缺失突变，在基因 CDS 序列中进行 NHEJ 修复很大概率产生移码突变^[15]。NHEJ 途径是常用的对蛋白质编码基因进行敲除的策略。CRISPR 技术出现之后很快就被应用于多种细胞水平和模式生物个体水平的基因编辑，利用 CRISPR/Cas9 系统结合大规模库筛策略可以实现对基因功能的快速筛查和研究^[16]。

通过技术创新 CRISPR/Cas9 系统衍生出了多种基因组靶向工具，通过突变 Cas9 蛋白 DNA 酶活结构域，可以构建仅保留一个 DNA 切割活性结构域，即切口活性的 nCas9 (Cas9 nickase)^[17]，或者将两个酶活结构域全部突变成只具有结合基因组能力的 dCas9 (catalytically dead Cas9)^[18]，dCas9 蛋白可以融合表达转录激活元件，实现对特定基因的原位激活表达^[19]，在大规模基因筛选策略和基因表达剂量不足相关疾病中有较大应用前景。dCas9 蛋白可以与胞嘧啶脱氨酶融合表达，实现胞嘧啶 C 转换为尿嘧啶 U，在复制过程中被 DNA 聚合酶识别为胸腺嘧啶 T，再结合 DNA 损伤修复最终实现胞嘧啶 C 转换为胸腺嘧啶 T^[4-5]，如果将 dCas9 换为保留对侧 DNA 链切割活性结构域的 nCas9，则可以激发细胞 DNA 损伤修复，促进以单碱基编辑后的 DNA 单链为正确参考模板来修复对侧链，从而提高单碱基编辑效率^[20]。细胞内的尿嘧啶 DNA 糖苷酶 (UDG) 会移除 DNA 链中的 U，从而使得编辑后的 U 又被修复为 C，通过融合尿嘧啶 DNA 糖苷酶抑制结构域 (UGI) 可以进一步提高单碱基编辑效率^[21]。nCas9 也可以与腺嘌呤脱氨酶融合表达，腺嘌呤脱氨酶可以使腺嘌呤 A 脱氨基转变为次黄嘌呤 I，在 DNA 复制过程中被识别为鸟嘌呤 G，从而以类似机制完成腺嘌呤到鸟嘌呤的转换^[20]。人类遗传疾病中很大一部分是由于蛋白质编码基因产生点突变，造成蛋白质的重要活性中心氨基酸突变^[10]，或者由于点突变引起翻译提前终止^[22]，或者影响 mRNA 的正常剪切^[23]，造成遗传疾病发生。使用单碱基编辑工具可以对部分点突变位点进行编辑修复，具有潜在的临床应用前景。通过对 Cas9 蛋白进行人工条件下的模拟进化过程可以筛选出具有更广泛 PAM 识别能力和低脱靶概率的 Cas9 变体蛋白^[24]。目前已经开发出了可以利用 NG 作为 PAM 基序的 Cas9 突变体 xCas9，实现了对全基因组更范围的覆盖。大约有 4 000 多种的 AT 突变为 CG 的致病点突变位点和大约 15 000 种的 CG 突变为

AT 的致病点突变可以使用现有的 spCas9 和 xCas9 融合表达剪辑编辑器来修复，为将来的临床应用提供更多选择^[24]。

2 CRISPR/Cas9在模式生物中的胚胎基因编辑

在以小鼠为模式生物的人类遗传疾病模型中的治疗性胚胎基因编辑开展较早，发展较快。在白内障小鼠模型中，*Crygc* 基因的点突变会造成翻译提前终止，形成显性遗传的渐进性的白内障表型，通过在杂合点突变小鼠细胞原核期胚胎中注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA，以及在外源供体 DNA 或者同源染色体上的野生型 *Crygc* 等位基因存在的情况下，可以对 *Crygc* 上的致病点突变进行修复，从而实现阻断白内障的发生发展^[25]。此外，CRISPR/Cas9 系统还在酪氨酸血症^[26]、肌营养不良等小鼠模型^[27]中成功实现了治疗性基因编辑。在小鼠的胚胎的基因编辑过程中也发现了几乎所有基因编辑的胚胎均为嵌合体^[25,28-29]，同时也存在一定概率的脱靶现象^[25]，脱靶和嵌合体问题是 CRISPR/Cas9 系统应用于临床中的两大障碍。

相比较小鼠的早期胚胎发育，非人灵长类的胚胎的发育进程和表观遗传修饰模式与人类更加接近，是理想的研究人类早期胚胎发育以及疾病的模式生物。受限于材料来源以及伦理限制，人类正常受精来源的胚胎基因编辑近年才有零星报道，而非人灵长类的胚胎编辑则开展较早^[29]。非人灵长类的胚胎基因编辑中嵌合体率和脱靶率是重要的关注指标，无论进行单基因敲除还是多基因同时敲除或者报告基因敲入，都会产生嵌合体，且嵌合比例较高，原因在于早期胚胎发育各个卵裂球的细胞周期存在一定差异，加之 Cas9-sgRNA 复合体表达与发挥作用的时间因素与切割后细胞修复机制，使得基因编辑在胚胎发育的不同时期多次出现^[30]。野生型嵌合体的产生主要是因为 Cas9-sgRNA 在部分卵裂球中未发挥作用，这可能是由于 Cas9 的切割活性或者 sgRNA 的结合效率较低，通过使用多条 sgRNA 靶向同一个基因的同一个小外显子可以降低嵌合率，避免野生型嵌合体^[29]。

在非人灵长类的几项研究中均未发现 sgRNA 的脱靶，这与此前一步法获得多基因编辑小鼠的工作一致，未发现 sgRNA 脱靶也可能受限于研究人员使用的检测手段为预测潜在脱靶位点逐个 PCR 检测的方法来检测脱靶，更精确的检测有赖于深度全基因组的测序。同时也有研究认为 sgRNA 有很

严重的脱靶问题^[31], 这可能与这些研究中选用的本身为低评分的 sgRNA 有关, 同时这些突变也可能不是由 Cas9 编辑造成^[32]。尽管如此, 作为潜在的人类疾病基因治疗的工具, sgRNA 的脱靶问题仍应严谨评定。CRISPR/Cas9 系统在不同的细胞背景下脱靶率存在不同, 在正常人胚胎干细胞和胚胎中脱靶现象较为少见^[33-35], 在小鼠胚胎中的工作也发现 CRISPR/Cas9 具有高的保真性^[28], 而在癌细胞系中则相反^[36]。sgRNA 似乎在癌细胞系中更容易发生脱靶, 在 EGFP 基因单拷贝的人骨肉瘤细胞系(U2OS. EGFP)中, 利用携带不同碱基错配数目的针对 EGFP 的 sgRNA 对 EGFP 进行编辑, 发现在 sgRNA 与基因组识别过程中对错配的容错可以达到 5 个碱基^[36]。总体来讲, CRISPR/Cas9 系统在正常胚胎干细胞和模式动物正常胚胎中脱靶率较低, 而在癌细胞系统较高。

3 CRISPR与人早期胚胎发育机制研究

由于受限于研究材料和研究手段以及伦理限制等多方面因素, 对人胚胎基因编辑研究人早期胚胎发育相关的机制一直停滞, 对于人的早期胚胎大多数研究主要还是依托分子生化手段或者高通量测序技术来对人早期胚胎发育过程进行描述并与小鼠或者灵长类早期胚胎发育模式进行对比^[37]。人早期胚胎发育模式与小鼠的早期胚胎发育存在较大不同^[38], 例如重要转录因子在两种生物早期胚胎发育中的调控机制差异以及合子基因组激活等重要胚胎发育事件发生时期存在重大不同^[39]。利用基因编辑工具对人胚胎进行基因编辑, 采用传统的敲除研究表型的手段来研究人早期胚胎发育过程中存在的与其他生物的差异有助于理解人与其他生物早期胚胎发育过程中的差异的生物学意义, 从而更好地理解人类自身。直到近两年, 随着 CRISPR/Cas9 系统的兴起和完善, 被开始应用于人胚胎的基因编辑, 除了以治疗性胚胎编辑为主的工作, 通过对一细胞原核期的人早期胚胎进行编辑, 敲除发育过程中关键的转录因子, 也发现了人早期胚胎发育与小鼠早期胚胎发育机制上的不同^[7]。

OCT4 是发育过程中的重要转录因子, 参与到早期胚胎发育及胚层分化, 对于细胞干性处于核心调控位置, OCT4 和 NANOG 以及 SOX2 相互调控, 共同形成胚胎干细胞多能性维持的三个重要转录因子^[40-41]。OCT4 在合子基因组激活或者胚胎基因组激活后启动表达, 并迅速发挥作用。OCT4 基因的

敲除在胚胎干细胞中会造成原始态和始发态胚胎干细胞多能性丧失, 而在小鼠早期胚胎发育过程中, OCT4 基因敲除后虽然可以发育到囊胚, 但是内细胞团的多能性丧失, 而且滋养外胚层的增殖也受到了限制^[41], 说明在小鼠的早期胚胎发育过程中, OCT4 在内细胞团和滋养外胚层的发育调控过程起关键作用。利用 Cas9-sgRNA 核糖核蛋白对人和小鼠的 PN 期的合子进行胞浆注射可以在早期胚胎中高效敲除 OCT4, 虽然由于方法限制不可避免地会产生不同突变方式的嵌合体或者存在个别未编辑的卵裂球, 但是仍然有明显的表型, 揭示了小鼠和人的早期胚胎发育过程中 OCT4 的作用机制差异^[7]。在人早期胚胎中敲除 OCT4 会造成多方面的发育异常。首先, 在人早期胚胎中敲除 OCT4 会显著降低胚胎基因组激活之后的胚胎发育效率, 同时各个卵裂球的基因表达谱也出现异常, 即使是在同一个嵌合体胚胎中的杂合敲除或者野生型的卵裂球, 其表达谱也处于异常状态。这一方面说明 OCT4 在胚胎基因组激活之后迅速发挥作用; 另一方面说明早期胚胎发育中各个卵裂球虽各自分裂, 但是其间仍有复杂的交互效应, 导致存在重大缺陷的卵裂球会拖累其他正常卵裂球的发育。其次, 敲除 OCT4 之后, 人早期胚胎的 NANOG 信号消失, 但是小鼠胚胎敲除 OCT4 之后可以发育成为囊胚, 且 NANOG 的染色信号正常, 这就说明了 OCT4 与 NANOG 之间的调控作用机制在人与小鼠早期胚胎发育过程中存在重大不同。此外, OCT4 敲除也会造成滋养外胚层相关基因 GATA2、CDX2 等下调^[7]。总的来说, 在人类胚胎中敲除 OCT4 表现出了与小鼠胚胎发育的较大差异, 人胚胎中敲除 OCT4 后会更早地停止发育, 并出现更为严重的异常, 这从一个侧面也反映了模式生物本身在研究人类自身遗传发育机制上的局限性。而 CRISPR/Cas9 系统在今后更多地利用人类胚胎编辑进行早期胚胎发育机制研究, 从而更直观真切地了解人类自身, 同时也会对探索辅助生殖存在的 IVF 较低的囊胚发育率的原因和解决由于胚外组织发育异常导致的流产等问题提供帮助。

4 CRISPR/Cas9应用于人类胚胎基因编辑

利用 CRISPR/Cas9 对人三原核胚胎进行基因编辑与对非人灵长类胚胎基因编辑在同一时期开展。人三原核胚胎在体外受精(IVF)和胞浆内精子注射(ICSI)过程中均会形成, IVF 中常由多精受

精导致，而在 ICSI 中有 4% 的受精卵会形成三原核^[46-47]，三原核胚胎在临床上为废弃胚胎，但是为研究人类早期胚胎发育基因编辑提供了丰富的材料和较低的伦理压力。由于受精卵的中心体由精子提供，ICSI 来源的单精双雌三原核胚胎具有正常中心体数目^[48]，在去除一个原核之后可以将胚胎恢复为正常二倍体核型，并有一定几率可以发育成为囊胚^[46]，在一定程度上可以代替正常 IVF 和 ICSI 来源的受精卵来进行早期胚胎发育的机制研究。

针对人类胚胎进行的基因编辑主要集中在两个方向上的用途，一方面是通过基因编辑结合细胞同源重组修复 (HDR) 对潜在的遗传疾病位点进行修复，另一方面是通过敲除早期胚胎发育相关的重要基因来研究人类早期胚胎发育相关机制。在几项对人类三原核胚胎基因编辑的研究中，研究人员大多选择了 β 型地中海贫血症的缺陷基因 HBB 作为基因修复的对象^[6,43](表 1)。地中海贫血症是一种严重的遗传疾病，主要成因是珠蛋白编码基因的缺失或者点突变导致无法形成有功能的血红蛋白。根据发生突变的基因不同分为 α 型和 β 型， β 型地中海贫血症由于不能形成有正常功能的血红蛋白 β 链同时 α 链过量形成，造成血红素运送氧能力的下降，出现不同程度的贫血症状^[49]。

三原核胚胎的细胞周期属于 S 期，一般认为 Cas9-sgRNA 发挥作用的阶段为 S 期到 G₂ 期^[50]。通过向 3PN 胚胎中注射 sgRNA、Cas9 mRNA 以及为用于同源重组修复提供模板的 ssDNA 来实现对由于突变提前终止的 HBB 基因的修复，但是最终发现这一修复方式只能修复大约 14.3% 的胚胎，而有 25% 的胚胎同源重组修复采用基因组上与 HBB 相似度很高的同源基因 HBD 作为模板修复，这暗

示了在一细胞胚胎中 DNA 损伤修复更倾向于利用内源同源序列来进行 HDR 修复^[6]。这一结果与在 M 期对携带致病突变的父源基因组进行基因编辑，利用母源正确的基因序列对其进行修复中的发现一致，即受精卵母本基因组的 DSB 损伤后，相比较外源引入的 DNA 供体，更倾向于利用内部同源序列进行修复^[8]。这与之前在小鼠中的报道也吻合，在不使用外源的 DNA 供体的情况下，依然有相近效率的携带致病突变的胚胎会被修复为正常野生型^[25]，这个可能是早期胚胎或者高等哺乳动物生殖细胞系维护自身基因组稳定性的策略^[8]。

在利用 3PN 胚胎进行基因编辑之后很快就有一科研团队利用 2PN 胚胎进行基因编辑^[43]。双原核胚胎可以通过对体外成熟的卵子通过细胞内精子注射 (ICSI) 再激活后获得。相比较 3PN 胚胎，体外成熟卵子来源的 2PN 胚胎有正常的二倍体基因组，同时早期胚胎发育模式也趋于正常，但是也具有一定的可移植和母体内发育的潜能，因此使用 2PN 胚胎进行基因编辑就具有更多的伦理压力^[51]。针对 HBB 的利用外源双链 DNA 作为修复供体进行同源重组修复，在 2PN 胚胎中的 HDR 效率可达 50%，远高于 3PN 胚胎中 HDR 效率 (10%)^[43]，这可能是正常胚胎本身相对于核型异常胚胎的特点。三原核胚胎本身的三倍体核型以及不正常的中心体个数导致的基因组稳定性下降和早期胚胎发育模式的异常^[46]与双链断裂后较低的同源重组修复效率可能存在内在的联系。使用 Cas9 蛋白代替原有的 Cas9 mRNA 用于一细胞 S 期胚胎进行胞浆注射，可以提高基因编辑效率，同时也能增强 HDR 修复^[8,43]。

与之前在灵长类模式生物胚胎编辑中遇到的问题一样，大多数的无论对 3PN 胚胎还是 2PN 胚

表1 人胚胎中利用CRISPR/Cas9进行基因编辑汇总

基因	编辑方式	胚胎类型	注射Cas9形式	胞浆注射时期	脱靶及检测方式	嵌合体	参考文献
HBB	HDR	3PN	mRNA	S期	显著T7E1&WES	WT&Indel	[6]
CCR5	HDR	3PN	mRNA	S期	未发现PCR	WT&Indel	[42]
HBB&G6PD	NHEJ/HDR	2PN&3PN	Protein	S期	未发现T7E1&WGS	非嵌合体&Indel	[43]
OCT4	NHEJ	2PN	mRNA/Protein	S期	未发现Digenome-seq	WT&Indel	[7]
MYBPC3	HDR	MII (IVF)	Protein	M期	未发现Digenome-seq	非嵌合体	[8]
RNF2	BE	3PN	BE3mRNA	S期	未发现GUIDE-seq	WT&Point mutation	[44]
HBB	BE	MII (IVM)	BE3mRNA	S期	未发现PCR	WT&Point mutation	[45]
HBB/FANCF/ DNMT3B	BE	3PN	BE3mRNA	S期	未发现PCR	Indel&G to A	[29]

注：BE：单碱基编辑；2PN：两原核时期胚胎；3PN：三原核胚胎；MII (IVF)：可用于体外受精的自发成熟的减数第二次分裂中期卵母细胞；MII (IVM)：体外诱导成熟的减数第二次分裂中期卵母细胞

胎进行的基因编辑都会存在较为严重的嵌合体现象^[6,42-43],这也是将CRISPR/Cas9基因编辑手段运用于遗传疾病治疗的技术瓶颈之一。仅仅通过Cas9蛋白替换Cas9 mRNA用于一细胞期胚胎基因编辑并不能很好地解决嵌合体的形成^[43]。通常对一细胞期胚胎注射sgRNA和DNA供体以及Cas9蛋白或者Cas9 mRNA是在受精16~18 h之后,这一时期形成了较为明显的雌雄原核,但是原核并未融合^[46],同时胚胎处于有丝分裂的S期,符合Cas9理论上发挥作用的时期^[50],注入的CRISPR/Cas9相关物质可以尽快发挥作用。但是,由于此时的雌雄原核正在进行DNA复制,如果所编辑区域正好已经是复制过的区域,那么Cas9在切割目标靶序列之后,两条新合成的DNA链就有可能以不同的修复方式进行。同时,Cas9 mRNA或者蛋白质由于自身半衰期的因素可能在第一次编辑之后由于并未彻底降解,依然存在一定量的有编辑能力的Cas9-sgRNA蛋白复合物,而导致嵌合体比例提高^[52]。Cas9 mRNA自身存在一定的半衰期,翻译出的Cas9蛋白也有一定的半衰期,这两个因素结合起来使得注射Cas9 mRNA总体上的发挥作用的时间可能长于注射Cas9蛋白,这就使得在相应的时间窗口内,Cas9-sgRNA复合物并不能被有效彻底降解,引起后期多次编辑,造成嵌合体率提升^[52]。另一方面,mRNA本身翻译成为蛋白质需要一定的时间,而Cas9蛋白与sgRNA组装也需要一定的时间,这些因素结合起来可能使得错过S期靶序列区域尚未发生复制的这一较小时间窗口,从而在合成两条DNA链之后再行进行基因编辑,产生不同的修复方式。通过在受精过程中引入CRISPR/Cas9可以更好地克服基因编辑之后产生的嵌合体现象^[8]。在进行ICSI时,将精子与Cas9-sgRNA核糖核蛋白一同注射进入MII时期的卵子,在原核尚未形成的时期,Cas9-sgRNA蛋白复合物就可以对父源MYBPC3缺陷基因进行切割引入双链断裂,同时在早期胚胎更倾向于使用另一方即母源MYBPC3基因作为供体对父源双链断裂进行修复,从而可以更高效地得到修复的非嵌合体的胚胎。这一时期,父源和母源基因组均处于G₀期,尚未进行DNA复制,只有一条待编辑链,如编辑后发生HDR修复则可形成一个完全修复的非嵌合体的胚胎。相比较在S期进行注射,在M期注射可以显著提高HDR的效率,同时消除嵌合体的形成,不过也依然会有一定比例的NHEJ修复的胚胎形成,但是NHEJ方式修复的胚胎也不是嵌

合体^[8]。存在争议的是,人受精卵中这种特殊的修复方式与已有的Cas9在S~G₂期发挥作用同时HDR在M期~早期G₁期会被下调的研究存在冲突,而且和雌雄原核形成、靠近和融合的传统认知过程有出入^[52],相关机制仍需深入研究(图1)。

对于父源携带的遗传疾病,在精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)上进行基因编辑修复遗传疾病是一个新的策略,属于生殖细胞介导治疗的范畴。在小鼠SSCs上进行的基因编辑工作^[53],为阻断遗传疾病的传递提供了新的方向,SSCs在体外培养的过程中印迹基因的甲基化修饰模式维持稳定,移植到小鼠睾丸内可以定植并向后发育产生具有功能的精子。如果可以建立患者来源的SSCs,利用基因编辑修复突变,再通过移植回睾丸或者体外培养得到具有功能的精子,就实现了在生殖细胞水平上阻断遗传疾病的目标。在SSCs进行基因治疗的优势还体现在首先可以结合全基因组测序彻底排除基因编辑带来的潜在脱靶,其次可以避免在对二倍体合子修复父源突变的过程中意外地导致母源产生新的突变,最后是不会产生嵌合体胚胎,相较于对后代胚胎进行的胚胎治疗性基因编辑安全性更高。

胚胎基因编辑之后的嵌合体存在部分以NHEJ方式修复的细胞,这样的修复方式相比较引入点突变可能会有更坏的影响,通过对NHEJ修复过程中关键的蛋白DNA连接酶IV进行抑制可以提高HDR修复的效率^[54],但是相关抑制剂对胚胎发育可能会产生不利影响,相关方法仍需要深入研究和严谨确认。嵌合体产生的另一个因素就是Cas9的半衰期超过了适合进行修复性基因编辑的窗口期,导致在胚胎发育后期仍具有切割活性引起多次编辑。在非人灵长类的研究中发现,通过在Cas9蛋白中添加促进泛素化蛋白降解的序列可以缩短Cas9蛋白的半衰期,但不影响其编辑活性,最终降低嵌合体突变的形成^[52]。

5 单碱基编辑工具应用于人类胚胎基因编辑

在人类早期胚胎中,可以使用单碱基编辑工具对胚胎进行基因编辑,实现对T→C和A→G突变的遗传疾病进行修复^[44,55]。在人三原核胚胎中使用第三代单碱基编辑工具(BE3)APOBEC-XTEN-dCas9(A840H)-UGI可以对RNF2实现C→T的单碱基编辑,使用GUIDE-seq也未发现脱靶存在,但是,在编辑过程中除了主要的C→T的突变模式,还存在C→G和C→A的突变模式^[44,55]。β地中海

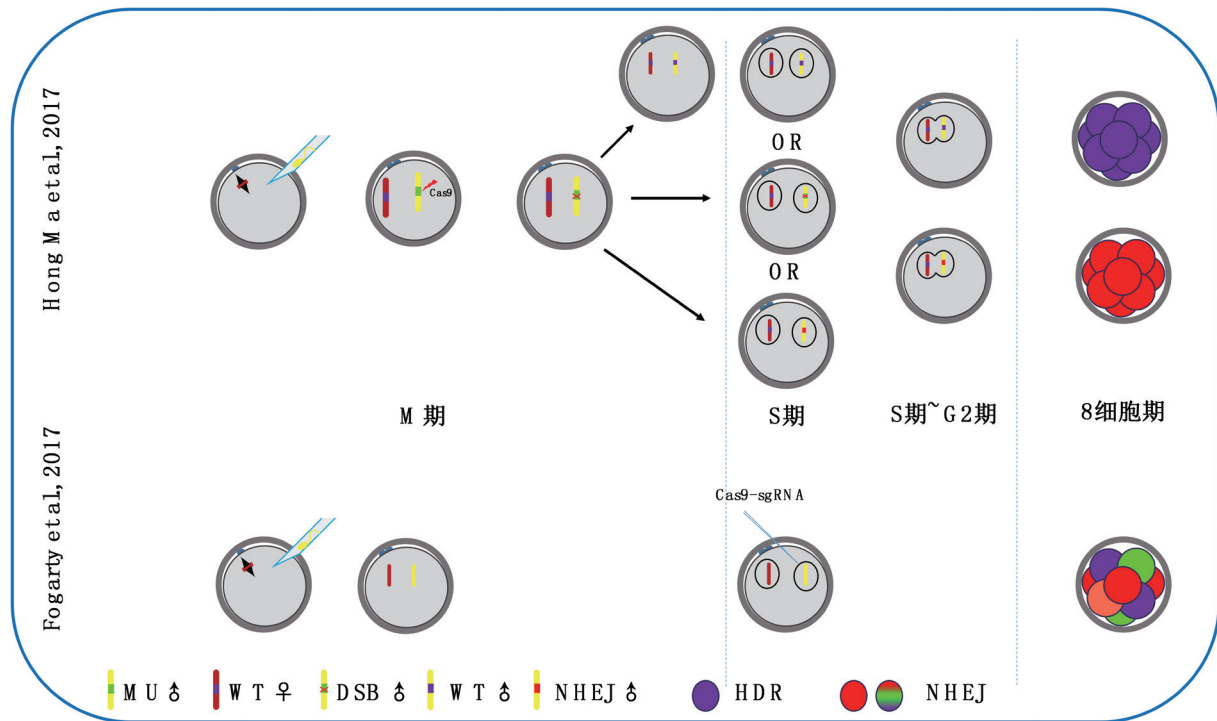


图1 两种人早期胚胎编辑策略

贫血症存在 HBB-28 A→G 的致病突变，该致病突变导致 HBB 基因表达量下降，是中国地中海贫血症主要突变类型之一。通过在体细胞核移植构建的纯合 HBB-28 A→G 突变胚胎中利用 BE3 进行单碱基编辑，可以部分修复致病突变，但是最终的胚胎会形成嵌合体，同时也发现存在意外的 G→C 的突变。在该研究中，使用潜在脱靶位点 PCR 检测未发现脱靶现象的存在^[45,55]。另一项研究中，对 HBB 基因在 3PN 胚胎中使用 BE3 进行编辑，大约有 42% 的胚胎发生突变，单个胚胎内的突变率为 6%~52%，差异较大^[44]，同时使用改进 PAM 的 Cas9 同源蛋白可以对更广泛区域的靶序列进行编辑^[24]。对不同靶位点的编辑的效率差异与序列本身和设计的 sgRNA 效率有关^[56]。

融合的 APOBEC1 倾向于对第五位的胞嘧啶 C 进行编辑，但是同时对于临近的 C 也存在编辑活性，因此对于 C 含量较高的靶目标区域进行编辑可能会造成额外的突变^[4,20]。由于密码子的简并性，不同位置的 C 突变为 T 对翻译后蛋白的影响存在差异，因此部分额外的 C→T 突变可能会产生同义突变，一定程度上缓解了额外编辑的不利影响。在人源细胞系中通过全基因组测序并未发现单碱基编辑工具融合蛋白会对基因组引入随机的 C→T 突变^[44-45,55]，这仍需要进行更高深度的全基因组测序检测以彻底排除潜在的随机突变，单碱基编辑产生的脱靶主要

是由 sgRNA 的脱靶导致，因此应该以更严谨的方式设计和验证 sgRNA。总的来讲，单碱基编辑技术应用于人胚胎治疗性基因编辑还处在摸索验证时期，距离真正的临床应用还有非常长的路要走。

6 CRISPR/Cas9系统与成体基因治疗

在胚胎水平的基因治疗，由于目前手段并不成熟，还存在较高的嵌合体率和不可预知的脱靶问题^[57]。而成体基因治疗则有一定的优势：首先就是避免了对人类胚胎操作的伦理学限制；其次是已有的基因治疗病例表明^[58]，成体水平的基因治疗已有明朗的临床应用前景。虽然 CRISPR/Cas9 技术尚没有进行深入的临床试验，但是可以预见其未来会在基因治疗应用中发挥重要作用。

I 型人类免疫缺陷病毒是目前世界上分布最广泛，感染人数最多的艾滋病病毒亚型，其特异性感染 CD4⁺ 的细胞，破坏人体免疫系统，造成免疫缺陷综合征^[59]。趋化性细胞因子受体 5 (CCR5) 是 HIV-1 感染 CD4⁺ 细胞过程中的关键蛋白，参与到 HIV-1 包膜表面蛋白与 CD4 受体相互作用从而促进感染^[59]。缺陷的 CCR5 蛋白可以抵抗 HIV-1 部分亚型对 CD4⁺ 细胞的感染，最早在 2009 年对一例急性髓性白血病并发 HIV-1 型病毒感染患者，利用配型的，具有纯合 CCR5 32 bp 缺失突变体的造血干细胞移植，使得患者体内极低的 CD4⁺ T 淋巴细胞密

度重新获得增长,并消除了 HIV-1 病毒,最终结果呈 HIV-1 阴性,同时还治愈了急性髓性白血病^[59]。异体移植造血干细胞的主要困难在于配型困难,利用 CRISPR/Cas9 系统可以对人类淋巴细胞抗原 (HLA) 进行编辑来避免免疫排斥,或者采用自体造血干细胞移植策略^[60]。通过分离 HIV-1 型感染患者的 CD34⁺ 造血干细胞,可以在体外进行有限时间的培养和扩增,结合 CRISPR/Cas9 系统对 CCR5 基因进行编辑,构建 CCR5 缺失突变的造血干细胞,再通过回输回患者体内,定植归巢的造血干细胞会产生可以抵抗 HIV-1 侵染的带有 CCR5 突变型的 CD4⁺ T 淋巴细胞,从而实现对患者的免疫系统进行重建,实现对 HIV-1 型病毒的清除^[9,61]。在小鼠水平的研究表明,基因编辑敲除 CCR5 之后的造血干细胞可以在联合免疫缺陷小鼠体内定植,并产生携带 CCR5 基因缺陷的 CD4⁺ T 淋巴细胞,实现对依赖 CCR5 介导途径感染的 HIV-1 型病毒的抵抗。虽然在以前的研究中使用锌指核酸酶和 TALENS 技术均可以在造血干细胞/祖细胞中实现对 CCR5 的敲除,但是相对于另外两种技术,CRISPR/Cas9 有更高的编辑效率和更小的运载负荷^[9,61]。

遗传性耳聋是一种常见的遗传疾病,在新生儿中的发病率大约为 0.1%^[62]。耳聋导致交流困难,同时影响运动能力,严重降低病患的生活质量。遗传性耳聋有多成因,主要由于单基因或多基因突变^[62],也有线粒体疾病引起的遗传性耳聋^[63]。大多数的遗传性耳聋是由于基因突变引起了耳蜗感觉毛细胞发育异常和功能缺失,破坏了感觉毛细胞将声波机械振动转化为神经兴奋电信号的能力。常染色体遗传病例中大约 80% 的患儿为常染色体隐性遗传病,其余 20% 为常染色体显性遗传病^[64]。跨膜通道样蛋白 1 (TMC1) 突变会造成常染色体显性遗传的遗传性耳聋^[65]。基因治疗手段应用于治疗遗传性耳聋早先已有人提出与尝试,CRISPR/Cas9 系统开发后为治疗遗传性耳聋提供了新的工具。在“贝多芬小鼠模型”中,Tmc1 基因存在一个 1235 位的 T 突变成 A,形成显性致病突变,小鼠出生后耳蜗中的内毛细胞和外毛细胞相继死亡,造成杂合突变小鼠在出生后渐进性地听力丧失。利用脂质体包装 Cas9-sgRNA 核糖核蛋白结合内耳注射的手段可以将其运送到新生幼鼠耳蜗处,转染进入耳蜗处的毛细胞,通过切割具有显性致病突变的 Tmc1 基因引入双链断裂损伤,再通过 NHEJ 修复形成移码突变,最终总体上降低了突变型 Tmc1 表达,终止了渐进性听

觉丧失,一部分修复的感觉毛细胞可以承担小鼠的听觉系统的功能维持^[10]。与传统的 AAV 病毒运载工具相比,脂质体运载可以避免刺激机体免疫系统,安全性更高^[66]。该方法较为适用于治疗遗传性耳聋这类显性遗传突变,即通过敲除掉具有显性遗传突变的等位基因就可以很大程度上实现功能恢复。

对于一些功能缺失型突变体,修复较为困难,往往需要通过外源的 DNA 替换掉携带缺失型突变的位点或者片段,通常在分裂期的细胞中可以通过提供外源供体 DNA 的方法,利用双链断裂损伤之后的 HDR 修复来实现致病突变修复,但是对于像神经细胞这种终末分化细胞,同源重组修复活性很低,双链断裂损伤常常通过 NHEJ 途径修复。已有研究也开发出了以 NHEJ 为基础的同源重组非依赖型 (HITI) 的靶位点整合策略,通过 Cas9-sgRNA 对基因组靶位点区域切割,同时切割供体质粒或者 AAV 病毒载体将其线性化,线性化后的 DNA 片段有很大概率被双链断裂处捕捉并插入整合进入基因组^[67]。AAV 病毒载体的单链基因组和反向末端重复序列也可能本身就具有激发非分裂细胞同源重组修复的能力^[68]。利用 HITI 方法在小鼠模型上可以部分恢复失明小鼠的视觉反应^[69],这就暗示了结合 CRISPR/Cas9 系统和 HITI 策略对未来成体水平成熟体细胞功能缺失型遗传疾病的治疗有巨大应用前景。总的来说,CRISPR/Cas9 应用于成体基因治疗已取得一定的临床尝试和较多的动物模型试验,相关的创新方法具有潜在开发利用价值。

7 结语

对于治疗性胚胎编辑而言,脱靶和嵌合体会造成不可预知的未来风险,同时承担巨大的伦理压力。对于细胞系而言,形成的脱靶或其他形式的突变可以通过克隆挑取和高深度的全基因组测序来排除,而对于早期胚胎而言,脱靶和嵌合体的检测与移植胚胎的完整性要求本身就存在难以调和的矛盾,我们不能对整个胚胎全部细胞进行脱靶和基因型检测,同时类似第三代辅助生殖的,利用少量滋养外胚层 (TE) 细胞进行基因组完整性的检测方式进行基因编辑胚胎的检测又无法反映整个胚胎是否为嵌合体。因此治疗性胚胎编辑还有很长的路要走,需要提高到近乎绝对精准与极高的编辑效率,虽然现阶段各类 CRISPR/Cas9 基因编辑工具有高的效率和精准度,但是运用于治疗性胚胎编辑还是远远不够的。相比较治疗性胚胎编辑,成体的基因治疗

拥有更大的容错性，同时一些疾病部分功能细胞实现修复就可以获得极大的功能改善，因此中短期内成体基因治疗仍然是首选，也会是 CRISPR/Cas9 真正发挥医学治疗威力的领域。对于人类胚胎编辑，基础研究仍为主要的方向，利用 CRISPR/Cas9 系统可以对人类早期胚胎发育机制进行深入研究，将其他模式生物的研究成果上升为对人类自身的研究，实现更深的自我认知。

[参 考 文 献]

- [1] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 230-2
- [2] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 2006, 1: 7
- [3] Schumann K, Lin S, Boyer E, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 10437-42
- [4] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-4
- [5] Ma YQ, Zhang JY, Yin WJ, et al. Targeted AIDID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods*, 2016, 13: 1029-35
- [6] Liang PP, Xu YW, Zhang XY, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2015, 6: 363-72
- [7] Fogarty NM, McCarthy A, Snijders KE, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 2017, 550: 67-73
- [8] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 2017, 548: 413-9
- [9] Xu L, Yang H, Gao Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated CCR5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance *in vivo*. *Mol Therapy*, 2017, 25: 1782-9
- [10] Gao X, Tao Y, Lamas V, et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents. *Nature*, 2018, 553: 217-21
- [11] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 233-9
- [12] Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 8096-106
- [13] Kato T, Hara S, Goto Y, et al. Creation of mutant mice with megabase-sized deletions containing custom-designed breakpoints by means of the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2017, 7: 59
- [14] Wei LX, Wang XK, Yang SM, et al. Efficient generation of the mouse model with a defined point mutation through haploid cell-mediated gene editing. *J Genet Genomics*, 2017, 44: 461-3
- [15] Heidenreich E, Novotny R, Kneidinger B, et al. Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells. *EMBO J*, 2003, 22: 2274-83
- [16] Chen SD, Sanjana NE, Zheng KJ, et al. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 2015, 160: 1246-60
- [17] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154: 1380-9
- [18] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10: 957-63
- [19] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159: 647-61
- [20] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464-71
- [21] Wang LJ, Xue W, Yan L, et al. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor. *Cell Res*, 2017, 27: 1289-92
- [22] Vidal R, Frangione B, Rostagno A, et al. A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature*, 1999, 399: 776-81
- [23] Duerschmid C, He YL, Wang CM, et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat Med*, 2017, 23: 1444-53
- [24] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556: 57-63
- [25] Wu YX, Liang D, Wang YH, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659-62
- [26] Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 551-3
- [27] Xu L, Park KH, Zhao LX, et al. CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in mdx mice. *Mol Therapy*, 2016, 24: 564-9
- [28] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153: 910-8
- [29] Zuo EW, Cai YJ, Li K, et al. One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Res*, 2017, 27: 933-45
- [30] Niu YY, Shen B, Cui YQ, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156: 836-43
- [31] Schaefer KA, Wu WH, Colgan DF, et al. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing *in vivo*. *Nat Methods*, 2017, 14: 547-8
- [32] Lareau C, Clement K, Hsu JY, et al. "Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing *in vivo*" are most

- likely pre-existing sequence variants and not nuclease-induced mutations. bioRxiv 159707
- [33] Smith C, Gore A, Yan W, et al. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 13-4
- [34] Suzuki K, Yu C, Qu J, et al. Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 31-6
- [35] Veres A, Gosis BS, Ding Q, et al. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 27-30
- [36] Fu YF, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 822-8
- [37] Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol*, 2016, 18: 700-8
- [38] Niakan KK, Eggan K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Dev Biol*, 2013, 375: 54-64
- [39] Yan LY, Yang MY, Guo HS, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 1131-9
- [40] Loh YH, Wu Q, Chew JL, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2006, 38: 431-40
- [41] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, 122: 947-56
- [42] Kang XJ, He WY, Huang YL, et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33: 581-8
- [43] Tang LC, Zeng YT, Du HZ, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics*, 2017, 292: 525-33
- [44] Li GL, Liu YJ, Zeng YT, et al. Highly efficient and precise base editing in discarded human tripronuclear embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 776-9
- [45] Liang PP, Ding CH, Sun HW, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 811-22
- [46] Munne S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Human Reprod Update*, 1998, 4: 842-55
- [47] Simon C, Rubio C, Vidal F, et al. Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after *in-vitro* fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reprod Fertil Dev*, 1998, 10: 87-92
- [48] Palermo G, Munne S, Cohen J. The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod*, 1994, 9: 1220-5
- [49] Olivieri NF. The β -thalassemias. *N Engl J Med*, 1999, 341: 99-109
- [50] Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 113-39
- [51] Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, et al. Don't edit the human germ line. *Nature*, 2015, 519: 410-1
- [52] Tu ZC, Yang WL, Yan B, et al. Promoting Cas9 degradation reduces mosaic mutations in non-human primate embryos. *Sci Rep*, 2017, 7: 42081
- [53] Wu Y, Zhou H, Fan X, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, 2015, 25: 67-79
- [54] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 538-42
- [55] Zhou CY, Zhang ML, Wei Y, et al. Highly efficient base editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8: 772-5
- [56] Guo XY, Li XJ. Targeted genome editing in primate embryos. *Cell Res*, 2015, 25: 767-8
- [57] Caplan AL, Parent B, Shen M, et al. No time to waste--the ethical challenges created by CRISPR CRISPR/Cas, being an efficient, simple, and cheap technology to edit the genome of any organism, raises many ethical and regulatory issues beyond the use to manipulate human germ line cells. *EMBO Rep*, 2015, 16: 1421-6
- [58] Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent β -thalassemia. *N Engl J Med*, 2018, 378: 1479-93
- [59] Hutter G, Nowak D, Mossner M, et al. Long-term control of HIV by *CCR5* Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 2009, 360: 692-8
- [60] DeWitt MA, Magis W, Bray NL, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 360ra134
- [61] Holt N, Wang JB, Kim K, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to *CCR5* control HIV-1 *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 839-47
- [62] Chien WW. A CRISPR way to restore hearing. *N Engl J Med*, 2018, 378: 1255-6
- [63] Pandya A. Nonsyndromic hearing loss and deafness, mitochondrial[M]. Seattle: University of Washington, 1993
- [64] Chien WW, Monzack EL, McDougald DS, et al. Gene therapy for sensorineural hearing loss. *Ear Hear*, 2015, 36: 1-7
- [65] Pan BF, Geleoc GS, Asai Y, et al. *TMC1* and *TMC2* are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear. *Neuron*, 2013, 79: 504-15
- [66] El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release*, 2004, 94: 1-14
- [67] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, 540: 144-9
- [68] Gaj T, Epstein BE, Schaffer DV. Genome engineering using adeno-associated virus: basic and clinical research applications. *Mol Ther*, 2016, 24: 458-64
- [69] Nishiyama J, Mikuni T, Yasuda R. Virus-mediated genome editing via homology-directed repair in mitotic and post-mitotic cells in mammalian brain. *Neuron*, 2017, 96: 755-68